

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number :

62-259597 = CA108: 166121p

(43) Date of publication of application : 11.11.1987

.....

(51) Int.CI.

C12P 21/02

(21) Application number: 61-104319

(71) Applicant : AJINOMOTO CO INC

07.05.1986 (72) Inventor ; (22) Date of filing :

HONDA YUTAKA

TSUCHIYA TOYORITO TAKEMOTO TADASHI YUGAWA TOSHIHIDE

(54) ENSYMIC SYNTHESIS OF N-PROTECTED PEPTIDE

(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the fitled compound, by reacting an N-protected amino acid with an amino acid in an aqueous layer in a two-phase system reaction medium of an organic solvent containing a quaternary ammonium salt, etc., and water using a proteclytic entyme and migrating the resultant product to an organic solvent phase.

CONSTITUTION: An N-protected amino soid, e.g. N-acetyl-1-aspartic acid, etc., or a derivative thereof is reacted with an amino apid, e.g., L-phenylalanine, etc., or a derivative thereof in an aqueous layer in a two-phase system reaction medium of a water-immiscible organic solvent containing a dissolved quaternary ammonium salt, e.g. trioctylmethylammonium chloride, etc., or queternary phosphonium salt and water using a proteclytic anzyme to form an Gprotected pertide containing one or more carbonyl groups. The resultant Nprotected peptide is then converted into a lipophilic queternary ammonium sait or phosphonium selt and migrated to the organic solvent phase to afford the aimed compound.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

(Date of sending the examiner's

decision of rejection[

[Mind of final disposal of application

other than the examiner's decision of

rejection or application converted

requestration)

[Date of final disposal for

amplication

[Patent number]

[Date of registration]

INumber of supesi against examinar's

desision of refection)

Date of requesting appeal against

swaminer's decision of rejection)

[Date of extinction of right)

Copyright (C); 1998, 2003 Japan Patent Office

◎公開特許公報(A)

四62-259597

@lnt_Cl.4

識別記号

庁内整理番号

公公署 昭和62年(1987)11月11日

C 12 P 21/02

6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

の発明の名称

の発 明 者

Nー保護ベプチドの酵素的合成法

31 *

邻特 頤 昭61-104319

顧昭61(1986)5月7日 ②出

No. 裕 砂鈴 明 者 75. 母発 明 者 十 屋 费 人 Œ 砂発 明 者 47 滋

川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

味の緊株式会社 创出 類人

錃

Ш

東京都中央区京橋1丁目5番8号

1. 難明の名称

N、保護ペプテソの際案的合成法 2.特許額求の範囲

(1) N-保護アミノ驚またはその勝導体とアミ ノ酸またはその誘導体とを、4級アンモニウム塩 重たはる般ホスホニウム塩を指解した水非温和性 有機磨媒と水との2相系度応媒体中化おいて水圏 で張自分解酵素を用いて反応させ、生成した少く とも1つのカルサキシル基をもつN-保護ペプチ どを競估性のも数アンモニウム塩またはも数ホス 水ニウム線として有機器鉄相に移行させることを 杵骸とするw~保護ペプテドまたはその誘導体の 辨案的分成法。

(2) N-保糖アミノ酸またはその酵源体とアミ ノ酸またはその鉄道体とを水中で最白分解解案を 用いて反応させ、生成した少くとも1つのカルサ キシル基をもつN・保護ペプテドをも数アンモニ ウム塩生たは4額ホスポニウム塩を溶解した水井 混和性有機器はで抽出回収することを特徴とする

N、保護ペプテドまたはその誘導体の容異的合成

3. 発明の評細な戦明

本発明は、N・保護ペプチドの勝葉的合成法に 関し、更に難しくは少なくともよつのカルボキシ ル基をもつN - 保機ペプテドの整案的合成法に関 100

近年、ペプテド合成において、解案を用いる方 彼がセラミ化を超たまないという理由から採用を 張め、横々のペプテド合成への利用が試みられて いる。ととろで、との方法では簡果として無白分 解謝装を用いる為、通例、一旦也成したペプチド の加水分解反応を伴う。因みに、この蛋白分解解 業を用いる反応は、扇知の如く、平衡反応である。

従って、ペプチド結合生成反応を効率よく進め る為には加水分解反応を抑制するのが重要なポイ ントであり、現状では、生成物を沈澱させて反応 系外に除き加水分解反応を訪げる方法や、水と提 和しない有機解膜を水化設加した2相系反応媒体 中で反応を行ない、生成物を有機商機層側に抽出

(2)

して反応条外に除く方法が主として用いられている。しかし、これらの方法では、生成物にカルッキン外基を持つものなどでは、通常の際東反応の条件の下では水に対する溶解度が高い為、化酸をせず、有機搭進層にも抽出されず、反応は効率とく進行しない。特に、裁賛のするノ墨の保服券として親水性の高いホルミル基(以下Aoと略記する。)やアセチル基(以下Aoと略記する。)を用いた場合は特に顕著である。ところで蛋白分解酵業にはエンド酸とエキノ型があるが、エキソ型の際来であるカルがキシャボティーを用いた場合には、アミノ基側の基質としてアミノ酸を使用するので、生成物のペプテドのカルガキシル末端は遊離のカルボキンル基となり、正に上記の例にあてはまる。

そとで本類明省らは、N-保護したアミノ酸あるいはその誘導体とアミノ酸あるいはその誘導体を置出りて反応させ、少なくとも1つのカルヤキシル基を有するN-保護ペアケドを効率よく合成する方法につき総章検討した結果、

(3)

方法ではN-保護・β-L-アコバルテル・L、フェニルアラニンが制生することや、腐食性の高い酢酸を使用することなど、優れた方法とは買いがたい。本発明方法を適用すれば、上配欠点を窓際し、N-保護・α-APのみを効率よく合成することができる。

実施例に示すように、本発明方法を用いると、水中にかける解案反応に比し、生成するN-保護ペプチャの収率が大幅に向上する。例えば、保護基がアセチル基の場合、水器後中の反応では、N-アセチルーなーも、アスペルチルーし、フェニルアラニン(以下、Ac、はーAPと膀胱する。)の収率は52%(比較例2)であるが、本発明方法をもちいるとAc-ローAPの収率は20%(実施例7)に向上する。又、保護基がベンジルカキンカルポニルとの場合も、水溶液中の反応ではN-ペンジルオキンカルポニルーの一し、アスパルナルーと、フェニルアラニンの収率は24%(比較例5)であるが、本発明方法を用いると8%(実施例15)に向上した。

類くべきことに、本野素反応を有機解擬と水との2相条反応媒体中で4数アンモニウム協あるいは4数ホスホニウム協の存在下に行なうことにより、本来有機解擬度には移行しない性成物を観機性の4数アンモニウム協あるいは4数ホスホニウム協として、有機解媒際に移行させ、ペプチド生成反応を効率よく進行させ得る事を見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明方法は、近年、優れた甘味剤として在自されているアスペルテーム(ローL・アスパルチルーL・フェニルアラニンメテルエステル)の重要な製造中間体であるN、保護・ローL・アスペルテル・L・フェニルアラニン(以下、N・保護・ローAPと時配する。)の合成に適用すれば特に効力を発揮する。即ち、N・保護・ローAPは容易にアスパルテームに変換される(特公路60-60,200)が、N・保護・ロー APの製法としては唯一、N・保護・ローアスパラヤン強筋水物とレーフェニルアラニンを酢酸中で反応させる方法がしられている(特公路55~26,133)が、この(4)

本発明方法によると、鮮りに2相系反応媒体を 用いてNー保護ペプチド合成反応を行ない、生成 したN、保護ペプチドを設施性の4級アンモニウ ▲塩あるいは 4 般ホスホニタム塩として有機溶凝 際に移行させるととによりペプチャ生成反応を効 ※よく進行させ得るが、また、然をにだ、保護で ミノ酸あるいはその誘導体とアミノ酸あるいはそ の誘導体とを水中で蛋白分解酵素を用いて反応さ せた後、有機器態と1級アンモニウム塩もるいは 4級ホスホニウム塩を添加し、生成したガー保護 ペプチドと原料のN-保護アミノ酸あるいはその 懸導体とアミノ酸あるいはその誘導体の有機密媒 /水の分配係数の差を利用して生成したN-保護 ペプサドを有機密媒像に抽出するととも出来る。 :有機將撰屬と水屬とを分離した後、繁1の方法 により、水陽に再渡、4般アンモニウム液あるい は4級ホスホニウム塩を含む有機器線を加えて2 層系反応媒体中でペプチド生成反応を行ない。と れを練遊して行なえば、ペアチャ生成反応を効率 よく進行させるととが出来るのはいうまでもない。 もちろん、解2の方法によってペプチド生政反抗 を終返し行なってもよい。

本発明方法において用いられるN-保護アミノ酸をよびその誘導体のN-保護港としては、通常のペプテド合成において使用される保護業、例えば、ホルミル基、アセテル港、ペンジルオキシカルボニル基、フェノキシアセテル基、1ーメテルー2ーアセテルとニル基及びアセトアセテル基が用いられる他、アミノ酸改革も用いられるが、中でもかれる心本、アセチル基、ペンシルオキシカルボニル基が好難にもあいたり、アミノ酸改革がN-保護アミノ酸としては、例えば、Nーホルミルーしーアラニルーしーアスパラギン酸がある。また、N-保護アミノ酸降降体としては、例えば、Nーホルミルーしーアスパラギン酸がある。また、N-保護アミノ酸降降体としては、例えば、N-ホルミルーしーアスパラギン酸ーの

N-保護アミノ酸またはその誘導体と反応させるアミノ酸またはその誘導体のうち、最後者のアミノ酸誘導体としては、例えば、L-フェニルア
(7)

素類、プタノール、アミルアルコールのごときアルコール類、メテルエテルケトンのごときケトン数、シエチルエーテル、ジイソプロピルエーテルのごときエーテル類をどが代表的なものであり、これらのうちの任意の2種類以上からなる複合器数を使用することも出来る。

本発明の方法においてもちいられる酵素として は蛋白分解酵素であれば毎に能限性ない。又、酵 素反応を行なり際の反応酸の内は使用する酵素の 種類により異なり、例えば、プロテアーせが(天 野製薬性製)及びオリエンターせるA(オリエン タル酵母社製)の場合は3~7で、サモアーせ (大和化成社製)の場合は6~8である。本発明 の酵素反応は認度10~90℃、酵素活性を維持 する観点からは20~50℃で行なりとよい。

本務明の方法において、商出発物質の使用機能 には特に制限はないが、ペプケド生成反応をより 効率よく進行させるためには、高い方が望ましい。 ペプケド生成反応を進行させるという観点からは、 出発物質の機能が重要であって、両者の使用比率 ラムンメチルエステルがある。

なお、N-保護アミノ強またはその誘導体とそれに反応させるアミノ触またはその誘導体との組合せは、生成するN-保護ペプチドまたはその誘導体が少くとも1つの遊離のカルポキンル基をもつものでなければならない。これは、前述のよりに、生成したN-保護ペプチドまたはその誘導体を有機器域に発解しているる級アンモニウム塩またはも級ホスホニウム塩のカチオン部分と結合させて新たにN-保護ペプナドまたはその誘導体の観他性のも級アンモニウム塩またはも級ホスホニウム塩またはも級ホスホニ

又、有機解放としては、4級アンモニウム塩ま たは4級ホスホニウム塩を解解し得てかつ次と均 一に混和しないもので出発物質及び目的生成物に 特に活性なものでなければ、いかなる解膜も使用 することが出来る。トルエン、キシレン、ペキサ ンのごと言葉化水素類、酢酸エチル、酢酸プチル のごと言エステル類、タロロホルム、潤塩化炭素。 エチレンジタロライドのごときハロゲン化炭化水 (8)

には特に制限はない。

本発明方法において用いられる4級アンモニウム塩あるいはホスポニウム塩としては特に無限はなく、トリオクチルメチルアンモニウムクロリド(ヘンケル社製 Aliquat 338をなど)、セチルジメチルペンジルアンモニウムクロリド、テトラローアチルホスホニウムプロマイドなどが好適にもちいられる。又、その最は所出発物質に対して多ければ多い報、目的生成物を有機得難層に移行させ得るが、あまり多すぎると辨案活性を低下させる場合があるので、両出発物質の総量に対して0.8~5.0重量倍の比率でもちいられる。

有機器媒際に第4数アンモニウム塩をたけれるホニウム塩の形で移行したN-保護ペプテドまたはその誘導体を分離回収するには、例えば、次のようにするとよい。4級アンモニウム塩をたはホスホニウム塩の形になったN-保護ペプテドまたはその誘導体は例えば食塩水等と混合することにより遊離させることができる。すなわち、分辨した有機器課題から食塩水で抽出すればよい。食塩

水の鍋皮は2~20(世盤)まかよい。

以下、実施例、比較例により、本別例をさらに 説明する。

夾 缩 例 1

N-アセテルーレーアスパラギン酸(以下、Ac-Asp と略記する。)の54 g(3.1 mmol)とレーフェニルアラニン(以下、pho と端記する。)の1 g(0.6 mmol)を遊量の水に密閉し、水酸化ナトリウム水密度を加えて出土5 に調整した後、全体を5 meにした。この水器後にブロテアーゼM(天野製薬社製)50 Wを添加した。完全に溶解させた後、トリエクテルメテルアンモニウムクロリド(Aliquat 3 3 6)1.2 5 g(3.1 mmol)のトルエン解殺10 Mを加え、4 9 でで2 4 時間級機した。

反応数中(水層及びトルエン湯)のA。- α-AP を流速数体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略 配する。)にて定数したととろ、Pho に対して 4.2 多の収率で生成していた(水溢 1.2 ま、トル エン湯 3.0 ま)。

(11)

8 (3 1 mmol) のクロロホルム搭載 1 0 miを加え、 4 0 C で 2 4 時間 磁雑した。

反応務中(水陽及びクロロホルム線)の As-α-APを、HPLC にて定盤したところ、Pho に対して4.2 多の収率で生成していた(水陽1.2 多、タロロホルム線3.0 多)。

災施例4

Ac-Asp 0.5 4 g (3.1 mmel) と Pho 0.1 g (0.6 mmal) を適勝の水化粉解し、水酸化ナトリウム水粉液を加えて対 4.5 に腐骸した後、会体を 5 %にした。この水粉散化プロテァーセM (天野製業社能) 5 0 % を添加した。完全に粉辨させた後、チトラロープテルホスホニウムプロマイド 1.0 5 g (3.1 mmol)の1、2-ジクロルエタン路液10 edを加え、40℃で24 時間振騰した。

反応被中(水陽及び1、2、ジタロルエタン勝) のAs-α-APを、HPLC Kて定載したところ、Pho に対して3.1 多の収塞で生成していた(水陽1.6 老、1、2、ジタロルエタン層1.5 番)。

比較例1(要施例1~5に刻する比較例)

突 始 例 2

Ac-Asp0.5 4 g (3.3 mme e) とPho 0.1 g (0.6 mmo e) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて対 4.5 に調整した後、全体を 5 mlにした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 5 0 場を添加した。完全に溶解させた後、トリオタナルメナルアンモニウムタロリト(A) iqust 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmo e) の四塩化炭素溶液1 0 mlを加え、40 CT 2 4 時間振過した。

反応被中(水層及び四線化設業層)のAe-α-AP
を、MPLC にて定数したところ、P8*に対して4.3
季の収率で生成していた(水層1.1 多、四線化設 来層3.2 多)。

寒 施 例 3

Ac-Asp 0.5 4 g (3.1 mmo L)とPho 6.1 g (0.6 mmo L)を通数の水に溶解し、水酸化ナトリウム水解液を加えてが 4.5 に調整した後、全体を 5 x l にした。この水溶液にプロテアーセM(天野製業社製)5 0 写を振加した。完全に容辨させた後、セナルジメチルペンジルアンモニウムクロリド123

(12)

At-Apr 0.5 4 g (3.1 mmot)とPh 0.1 g (0.6 mmot)を適量の水に将解し、水酸化ナトリウム水彩液を加えて削 4.5 に割散し木後、全体を 5 miにした。この水溶散にプロテナーゼが(天野製薬社製)50 彩を設加した。完全に溶解させた後、40 Cで 2 4 時間振過した。

水積中の Ae ~α ~ AP を HPLC にて定量したところ、 Pb・に対して 1.6 多の収率で生成していた。

爽施例 5

Ac-Asp 217g(124mmot)とPhs 0.1g(0.6 mmot)を適当の水に密解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて対 4.5 に調整した後、会体を 3 mlにした。この水溶液にプロティーを M(天野製薬社製)50 吹を添加した。完全に溶解させた後、トリオクテルメテルアンモニウムタロリド(Aliquet 3 3 6) 1.2 5 g(3.1 mmot)のトルエン密設10 mt かた、4 0 Cで 4 4 時間振騰した。

反応兼中(水陽及びトルエン暦)の Ao - 4 AP を、HPLC 化て定量したところ、 Pho に対して111 多の収率で生成していた(水層 3.3 多 , トルエン M 7 8 %) .

災縮例 8

At-Asp 2 1 7 g (1 2 4 mma 2) と pho 0.1 g (0.6 mmo L) を透透の水に発解し、水酸化ナトリウム水

耐放を加えて pl 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水粉液にプロテアー w M (天野製果社製) 5 0 恥を添加した。完全に燃料させた後、トリオクチルメチルアンモニウムクロリア (Aliquat 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmo L)のトルエン/ヘヤ

サン (1/1) 階級 1 0 ml を加え、 4 0 ℃で 4 4 時間接過した。

及応後申(水廠及びトルエン/ヘキサン層)の Ac-ローAP を、HPLC にて定盤したところ、Phe に 対して 1 1.0 多の収率で生成していた(水層 3.1 ま、トルエン/ヘキサン層 7.9 ま)。

実施館す

Ae-Asp 2.17g(12.4 mmol)とpho 0.1g(0.6 mmol)を調整の水紅樹解し、水酸化ナトリウム水解酸を加えて対 4.5 化酶酸した後、全体を 5 ml にした。この水粉酸ビブロテナーゼ M (天野製寒社 (15)

加えて対 4.5 に 減整した後、全体を5 がにした。 この水溶液にプロテアーゼM (大野製製社製) 200 等を筋加した。完全に 解解させた後、トリ オクチルメテルアンモニウムクロリド (Aligust 336)1.25g(31 mmol)のトルエン解験 10 ml を加え、40 Cで 48 時間接襲した。

反応液中(水層及びトルエン階)の Aα-α-AP を、SPLC にて定費したところ、Ph·κ に対して5.0 季の収率で生成していた(水滑1.5 %、トルエン 層3.5 %)。

US NO FEE O

Ac-Asp 0.5 4 g (3.1 mms 4) とPh a 0.1 g (0.6 tmno 4) を適能の水に粉解し、水機化ナトリシム水粉酸を加えて対3.0 に調整した後、全体を5 x d にした。この水解液にブロテアーゼM (天野製薬社報) 5.6 場を添加した。完全に解解させた後、トリオークテルメテルアンモニウムクロリド (Aliquat 3.3 g) 1, 2.5 g (3.1 mma 4) のトルエン解液 1.0 x d を加え、4.0 ℃で2.2 時間溶染した。反応液中 (水解及びトルエン海)の Ao-α-AF

製)50 脚を踏加した。完全に溶解させた後、セチルジメチルペンジルアンモニウムタロリド 246 ま (6.2 mmol)のタロロホルム階級 2 0 配を加え、 4 0 でで 4 4 時間振騰した。

反応被中(水陽及びクロロホルム陽)のAt-α-APを、MPLCにて定置したところ、Pho に対して20.1 *の収率で生成していた(水陽5.1 *. クロホルム圏15.0 *)。

比较例2(安施例5~7亿对する比较例)

A2-Asp 2.17g(12.5 mmeL)とPhe 0.1g(0.5 mmeL)を適強の水に解解し、水酸化ナトリウム水 解源を加えて対4.5 に開催した後、全体を 5 mlにした。この水解散にブロテアーセ州(火野製造社製)50 厚金額加した。完全に掛弾させた後、40 Cで4.4 時間報搬した。

本額中の Ae-α-AP を RPLC K T定量したととろ、 Phe K 対して 5.2 ※の収率で生成していた。

爽施例用

Ae-Aep 0.5 4 g (3.3 mmod)とPhe (1.1 g (1.6 mmod) を適載の水化粉解し、水镀化ナトリウム水粉被会 (16)

を、HPLC 化て定量したところ、Pho に対して3 4 多の収率で生成していた(水田の9 多,トルエン 週25 号)。

突旋约10

As-Asp 0.5 4 g (3.1 mmol) と Pho ① 1 g (0.6 mmol) を適能の水K密解し、水酸化ナトリウム水解酸を加えて声4.5 K 訓整した後、全体を 5 ml にした。この水器酸K アロテアーセM (天野災寒社製) 5 0 %を添加した。完全K 容解ませた後、トリオクテルメテルアンモニウムタロリド (Aliquat 3.3.6) 1.2 5 g (3.1 mmol) のトルエン解放1 0 mlを加え、25 でで9 8 時間 脳機した。

反応報中(水層及びトルエン樹)のAs-α-AP を、HPLC KT定量したところ、Phe K 対して4.0 その収率で生成していた(水層 1.2 %、トルエン 綴2.8 %)。

皮施例11

N-ホルミル-L-アスパラヤン機(以下、 For-Asp と解説する。) 0.5 g (3.1 mmol)と Pso 0.1 g (0.6 mmol)を適位の水だ所無し、水

(18)

酸化ナトリウム水解散を加えて出4.5 に調整した 扱、全体を 5 叫にした。この水解液にプロテアー せい (天野製薬社製) 5 0 物を輸加した。完全に 粉解された後、トリオクチルメチルアンモニウム グロリド (Ailquat 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmod) のトルエン解放 1 0 叫を加え、 4 8 ℃で 7 2 時間 縦微した。

反応数中(水陽及びトルエン炮)のN-ホルミルーは、カーは、L-アスパルチル・L-フェニルブラニン(以下、For-α-APと略記する。)をHPLCにて定置したところ、Pho に対してよりもの収率で生成していた(水陽ひフォ、トルエン陽228)。

For-Asp C. 5 g (3.1 mmad) と phs C.1 g (0.8 mmod) を適量の次に解解し、水漿化ナトリウム水溶液を加えて対 4.5 に總整した後、全体を 5 似にした。この水溶液にプロテアーセル (天野製薬社製) 5.6 脚を凝加した。完全に軽勝させた後、40 C T 7.2 時間超額した。

比較例3(契約例11亿對于石比較例)

水液中の For -α-AP を HPLC にて定量したところ、 (19)

ンタル酵母社製)50 砂を添加した。完全に解解させた後、トリナタテルノナルアンモニウムクロリド(Aliqual 336)1.25g(31 mmol)の 酢酸エナル解放10単を加え、40℃で71時間 振樹した。

反応液中(水陽及び酢酸エチル陽)の Fos-α-AP を HPLC にて定量したところ、 Pho に対して 1.1 を の収率で生成していた(水陽 0.3 を。酢酸エチル 層 0.8 を)。

比較例4(災施例13に対する比較例)

For-Asp 0.5 g (3.1 mmol)と Pho 0.1 g (0.6 mmol)を適量の水に粉解し、水液化ナトリウム水溶液を加えて川4.5 に調整した後、全体を5 miにした。この水溶液にオリニンターゼ5 A (オリエンタル酵母社製)50 吻を添加した。完全に熔解させた後、40℃で7.1 時間超級した。

水液中のFor-α-AP をNFLC にて定量したところ。Pho に対して 0.4 %の収率で生成していた。

與施例 1 4

N - ボルミルーレーアスパラヤン酸 - ローメチ

Pho に対して 0.8 第 0 収 率 7 生成していた。 実施例 1.2

For-Asp 2.0 s (1 2.4 mmot) と pho 0.1 g (0.6 mmot) を遊戯の水に裕解し、水酸化ナトリウム水裕報を加えてpH 4.5 に調整した後、全体を5 mlにした。この水解液にプロテアーせい (天野製業社製) 5 0 率を添加した。完全に超解させた後、トリオクナルメテルアンモニウムタロリド (Aliquel 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmot) のトルエン密報 1 0 mlを加え、4 0 c で 7 6 時間振頻した。

及応報中(水層及びトルエン層)のPor-Q-APをHPLC Kで定盤したところ、Pb。 K対して63%の収率で生成していた(水層20%、トルエン層43%)。

突施例13

For-Ask 0.5 g (3.1 mmot) とPbs 0.1 g (0.6 mmot) を適量の水に解解し、水酸化ナトリウム水解散を加えて叫る5 に調整した後、全体を5 seにした。この水解板にオリエンターセ5 A (オリエ(20)

ルエステル(以下、 Fos-Asp-OMe と酩酊する。)
0.5 4 g (3.1 mmol)とPhs 0.1 g (0.5 mmol)を確盤の水に解解し、水限化ナトリウム水溶液を加えて対 4.5 に顕著した後、全体を 5 mlにした。
この水解液にプロテアーせが (天野製薬社製)
5 0 呼を添加した。完全に解解させた後、トリオクテルメテルアンモニウムクロリド (Aliquat
3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmol)のトルエン密蔵
1 0 mlを加え、 4 0 c c 6 5 時間振器した。

反応液中(水陽及びトルエン層)のFor-a-AP をHPLC にて定量したところ、PS。に対して7.2 多の 収率で生成していた(水陽1.8 多,トルエン圏 5.3 多)。

比較例5(実施例14に対する比較例)

Par-Asp-Obs 0.54 g (3.1 mmol)とPhs 0.1 g (0.6 mmol)を適量の水に解解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて対4.5 に調整した後、全体を5mkにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製業社製)50 mを添加した。完全に溶解させた後、40℃で63時間接触した。

(22)

水散中の Pox-α-AP を BPLC にて定量したとこ る、 Pbx に対して 2 1 多の収率で生成していた。 実施例 1 5

N - サンジルオキシカルボニル - L - アスパラサン類 (以下、2-Asp と略配する。) 0.83 8 (3.1 mmol) と Pb * 0.1 g (0.6 mmol) を適盤の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて利4.5 に跨盤した後、全体を5mkにした。この水溶液にプロテアーゼM (天野製器社製) 5 0 吻を粉加した。完全に溶解させた後、トリオクナルメゲルアンモニウムクロリド (Aliquet 3 3 6)1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液1 0 がを加え、40 Cで 4 4 時間報激した。

反応被中(水湯及びトルエン陽)のN-ペンジ ルオキンカルサニル・ローしーアスパルテル・L -フェニルアラニン(以下、Z-ローAPと略配す る。)をMPLCにて定量したところ、Pho に対して B1季の収率で生成していた(水溜に1番。トル エン溜7.0番)。

比較例 6 (実態例 1 8 に対する比較例) (23)

ルオキシカルポニル・ロ、L・フェニルアラニンメチルエステル(以下、Z・ロ・APMと物能する。)をHPLCにて定盤したところ、Pb。に対して54.6
多の収率で生成していた(水圏18.9ヵ,トルエン圏36.6g)。

比较例7(與拍例16亿对する比较例)

2-Asp 0.67 g (2.5 mmoe)とPM 0.45 g (2.5 mmoe)を適量の水化粉解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて耐 6.2 に調整した後、全体を18 M にした。この水溶液にサモアーゼ(大和化成社製)120 %を動加した。完全に溶解させた後、40 でで3 時間振盪した。

水般中のZ-G-APMをHPLCKT定量したと ころ、Phe に対して 19.4 多の収率で生成してい た。

爽麴例!7

N ~ アセナル・L - アラニン (以下、Ac-ACS と終記する。) 0. 4 g (3.0 mmol) とし ~ ロイシ ン (以下、Leu と略記する。0.0 B g (0.6 mmol) を適盤の水化粧粥し、水酸化ナトリウム水器酸 2-Asp 0.83 g (3.1 mmol)とPso 0.1 g(0.6 mmol)を適量の水化料解し、水酸化ナトリウム水料液を加えて削4.5 に調整した後、全体を5%にした。この水料液にプロテフーゼが(天野製薬社製)50 Wを添加した。完全化粧料させた後、40℃で44時間銀樹した。

水液中の Z ~ α - AP を BPLC にて定義したところ、Ph。に対して 2.4 % の収率で生成していた。 ※ 施例 1.6

2-Asp 0.67 g (25 mmot)とし~フェニルア
ラニンメケルエステル(以下、FMと略配する。)
0.45 g (2.5 mmot)を適量の水化粉解し、水酸
化ナトリウム水溶液を加えて対 6.2 に調整した後、
全体を18 以にした。この水粉液にサモアーや
(大和化成社製)120 場を振加した。完全に粉
腰させた後、トリオクチルメチルアンモニウムク
ロリド(Aliquat 335)2.06 g (5.1 mmot)
のトルエン粉散20 以を加え、40 にて3 時間報 機した。

反応被中 (水 編及びトルエン層)のN - ペンジ (24)

を加えて呼4.5 に調整した後、全体を5.0 meにした。この水路後にプロテアーゼが(天野製業社製)50 場を添加した。完全に溶解させた後、トリオクチルメテルアンモニウムタロリド(Aliquat336)1.2 2 g (3.0 mmol)のトルエン溶液1.0 meを加え、40 にで4.9 時間接強した。

反応競中(水形及びトルエン粉)のAc-Ala-Lea を HPLC に で 定費したところ、Lea に 対して 2.3 を の 収率で 生成していた (水榴 9.6 %,トルエン 樹 1.7 %)。

比較例8(異施例17に対する比較例)

As-Ai* 0.4 g (3.6 mmost)とLeu 0.0 8 g (0.8 mmost)を遊騰の水に解解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて対4.5 に調整した後、全体を5 mfにした。この水溶液にプロテアーセが(天野製業社製)50 卵を添加した、完全に解解させた後、40 でで49時間振振した。

水 鞭中の A6-A1a-L86 を HPLCK て定 致したとと ろ、 Lea K 対して R. 7 多の収 率で生成していた。

突絡例18

(28)

比較例3と阿様に反応させて持ちれた For-Asp 2.3 g, For - a - APO 0 0 9 g 及び L - Pha 0.5 g を含む酵素反応被2 5 xkにトリオクチルメ チルアンモニクムクロリド6.2 5 g のトルエン醛 被5 0 xkを加え、piを6.0 に調整した後、3 7 C で15分間接続した。

トルエン圏を分離し、For-Asp、For-α-AP 及びを-PssをHPLC 化て定量したところ、トル エン層中にFor-α-APは 7 6 多拍出されていた。 一方、For-Asp、Pss は、それぞれ、9 多、7 多柏 出された化すぎなかった。因みに、Por-α-AP、 For-Asp 及び Pss の水-トルエン間の分配係数は、 それぞれ、135、0.04、0.03であった。

比較例 9 (突施例 1 8 亿 对 才 る比較例)

トリオクチルメテルアンモニウムクロリドを旅加しない以外は、実施例18と同様の実験を行なったところ、For-ローAPはトルエン層中に全く抽出されず、その分配係数は0であった。

突施例19

比較例1と開機に反応して得られた As-Asp 2.6g,

(27)

Ac-α-APB.015g及びPho Q.5gを含む経路反応 概25g6にトリメクテルメチルアンモニウムタコ リド G.25gのトルエン診験50mを加え、同を 4.4 に誤整した後、37℃で15分類接続した。 トルエン胸を分離し、Ac-Asp. Ac-α-AP及 びL-PhoをHPLCにて定様したところ、トルエ ン層中に Ac-α-APは63を抽出されていた。一 方、Ac-Asp, Pho は、それぞれ、9%,2%抽出 されたにすぎなかった。例みに、Ac-α-AP, Ac-Asp及びL-Pho の水-トルエン機の分配係数 は、それぞれ、1.03,097,003であった。

比較例10(突施例19 亿对于名比較例)

トリオクチルメテルアンモニウムクロリドを訴加しない以外は、実施例19と同様の実験を行なったところ。 Ae - ローAPはトルエン海中に全く抽出されず、その分配係数は0であった。

修許出願人 味の素株式会社

(28)